دانشگاه گیلان
دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی جهش DNA میتوکندریایی در بیماران مبتلا به واریکوسل

از:
نسرین غنمی گشتی

استاد راهنما:
دکتر زیور صالحی

مرداد ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی
گرایش سلولی تکوینی

بررسی جهش DNA میتوکندریایی در بیماران مبتلا به واریکوسل

از:
نسرین غنمی گشتی

استاد راهنما:
دکتر زیور صالحی

استاد مشاور:
دکتر علی حمیدی مدنی

مرداد ۹۱

تقدیم به:

خانم دکتر زیور صالحی

خداوندا تو را سپاس می‌گویم که حالم را به نیکی می‌گردانی و روزگارم را به حکمتت رقم می‌زنی.

در ابتدا خالصانه ترین و صمیمانه ترین سپاس‌ها را نثار خانواده‌ی عزیزم می‌کنم که همواره حمایتگر من در تمام مراحل زندگی هستند. از استاد راهنمای بزرگوارم، خانم دکتر زیور صالحی به خاطر راهنمایی‌های بی‌دریغشان سپاسگزارم و برایشان آرزوی توفیق روز افزون دارم.

از استاد مشاور بزرگوارم جناب آقای دکتر علی حمیدی مدنی به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر را دارم. از اساتید گرامی، جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی و جناب آقای دکتر حمیدرضا وزیری که داوری پایان نامه‌ی اینجانب را پذیرفتند، بینهایت سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر محمودرضا آقامعالی، نماینده‌ی محترم تحصیلات تکمیلی به خاطر حضورشان در جلسه دفاع کمال تشکر را دارم. از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های زیست شناسی، خانم‌ها هادوی، شایگان و امیدی و تمام دوستان عزیزم در آزمایشگاه های ژنتیک و تکوین صمیمانه سپاسگزارم.

در پایان از تمام بیمارانی تشکر می کنم که اگر لطف و رضایت آن ها نبود، این پروژه به انجام نمی رسید.

نسرین غنمی گشتی

مرداد ۹۱

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه
چکیده فارسی.....ط
چکیده انگلیسی.....ی

فصل اول: مقدمه
۱- مقدمه.....۱
۱-۱- واریکوسل.....۱
۱-۱-۲- اتیولوژی واریکوسل.....۲
۱-۱-۳- پاتوفیزیولوژی واریکوسل.....۳
۱-۱-۳-۱- افزایش دمای اسکروتال.....۳
۱-۱-۳-۲- واریکوسل و ایجاد استرس اکسیداتیو.....۴
۱-۱-۳-۲-۱- سایتوکین ها (ILs).....۵
۱-۱-۳-۲-۲- نیتریک اکساید (NO).....۶
۱-۱-۳-۲-۳- Gelial cell line-derived neurotrophic factor receptor α_1.....۶
۱-۱-۳-۳- تأثیر واریکوسل بر میزان آنتی اکسیدانت ها.....۶
۱-۱-۳-۴-واریکوسل والقای آپاپتوزیس.....۷
۱-۱-۳-۴-۱- نقش استرس گرما در القای آپاپتوزیس.....۸
۱-۱-۳-۴-۲- محرومیت از آندروژن و القای آپاپتوزیس.....۹
۱-۱-۳-۴-۳- عوامل سمی و القای آپاپتوزیس.....۹
۱-۱-۳-۵- واریکوسل و افزایش فشار سیاهرگی.....۱۰
۱-۱-۳-۶- واریکوسل و عدم تعادل هورمونی.....۱۰
۱-۱-۴- تأثیر واریکوسل بر فرایند اسپرماتوژنز.....۱۱
۱-۱-۴-۱- تأثیر واریکوسل بر تعداد اسپرم.....۱۱
۱-۱-۴-۲- واریکوسل و تحرک اسپرم.....۱۲
۱-۱-۴-۳- تأثیر واریکوسل بر مرفولوژی اسپرم.....۱۲
۱-۱-۴-۴- واریکوسل و واکنش آکروزومی.....۱۳
۱-۱-۵- عوامل مولکولی درگیر در واریکوسل.....۱۳
۱-۱-۶- نقش واریکوسل در آسیب به DNA ی اسپرم.....۱۵
۱-۲- مکانیسم های آسیب به DNA ی اسپرم.....۱۵

۱-۲-۱- تئوری آپاپتوزیس ناقص ۱۶
۱-۲-۲- تئوری بلوغ ناقص ۱۶
۱-۲-۳- استرس اکسیداتیو ۱۷
۱-۳- اندامک میتوکندری ۱۸
۱-۳-۲- ساختار ژنوم میتوکندریایی ۱۹
۱-۳-۳- جهش های DNA ی میتوکندریایی ۲۲
۱-۳-۳-۱- مکانیسم های ایجاد حذف در mtDNA ۲۳
۱-۴- ناهنجاری های میتوکندریایی ۲۵
۱-۴-۱- جهش های mtDNA در سرطان ۲۵
۱-۴-۲- جهش های mtDNA در اختلالات عضلانی ۲۶
۱-۴-۳- جهش های mtDNA در پیری ۲۶
۱-۴-۴- جهش های mtDNA در ناباروری مردان ۲۷
۱-۴-۴-۱- آسیب به DNA ی میتوکندریایی اسپرم ۲۸
۱-۴-۴-۲- موقعیت حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA ۳۰
۱-۵- هدف از تحقیق ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها
۲-۱- مواد و لوازم مورد نیاز ۳۲
۲-۱-۱- مواد و لوازم مورد نیاز جهت نمونه گیری ۳۲
۲-۱-۲- مواد و لوازم مورد نیاز جهت استخراج DNA از اسپرم ۳۲
۲-۱-۳- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز به منظور ارزیابی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده ۳۳
۲-۱-۴- مواد و لوازم مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ۳۳
۲-۱-۵- مواد و لوازم مورد نیاز در الکتروفورز محصولات PCR به کمک ژل آگارز ۳۴
۲-۱-۶- آماده سازی بافر ها و محلول ها ۳۴
۲-۱-۶-۱- بافر TBE با غلظت 10X (TBE-10X) ۳۴
۲-۱-۶-۲- بافر TBE با غلظت 1X(TBE-1X) ۳۴
۲-۱-۶-۳- محلول NaCl 5M ۳۴
۲-۱-۶-۴- محلول ۹۰٪ و ۴۵٪ اسپرم گرید ۳۵
۲-۲- وسایل و تجهیزاتی که به وفور در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می گیرند ۳۵
۲-۳- روش کار ۳۶
۲-۳-۱- نمونه گیری ۳۶
۲-۳-۲- آماده سازی اسپرم از نمونه های منی ۳۶

۲-۳-۳- استخراج Total DNA از اسپرم ۳۷
۲-۳-۴- ارزیابی DNA استخراج شده به کمک ژل آگارز (الکتروفورز افقی) ۳۸
۲-۳-۵- واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction) ۴۰
۲-۳-۵-۱- انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) جهت شناسایی حذف bp-۴۹۷۷ در DNA میتوکندریایی اسپرم ۴۰
۲-۳-۵-۱-۱- آغازگرهای (Primers) مورد استفاده در واکنش PCR ۴۱
۲-۳-۵-۱-۲- چرخه حرارتی واکنش PCR ۴۴
۲-۳-۵-۱-۳- پروفایل حرارتی واکنش PCR ۴۵
۲-۳-۵-۱-۴- الکتروفورز جهت بررسی کیفیت محصولات PCR ۴۵
۲-۴- آنالیز آماری ۴۶

فصل سوم: نتایج

۳- نتایج ۴۷
۳-۱- خصوصیات نمونه ها ۴۷
۳-۲- نتایج حاصل از سانتریفیوژ شیب چگالی ۴۷
۳-۳- نتایج بررسی های مولکولی ۴۸
۳-۳-۱- نتایج بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۰/۸٪ (الکتروفورز افقی) ۴۸
۳-۳-۲- نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) ۴۹
۳-۳-۲-۱- بررسی کیفیت قطعات DNA تکثیر شده مربوط به مرحله اول PCR توسط ژل آگارز ۲٪ (الکتروفورز افقی) ۵۰
۳-۳-۲-۲- بررسی کیفیت قطعات DNA تکثیر شده مربوط به مرحله دوم PCR توسط ژل آگارز ۲٪ (الکتروفورز افقی) ۵۱
۳-۴- نتایج آنالیز های آماری ۵۲

فصل چهارم: بحث

۴-۱- بحث ۵۴
۴-۲- پیشنهادات ۵۸

منابع ۵۹
پیوست ۷۰

فهرست اشکال

عنوان.....صفحه

شکل(۱-۱) واریکوسل.....۲
شکل(۱-۲) مسیرهای القا کننده آپاپتوز.....۸
شکل (۱-۳) دیاگرام شماتیک ساختار کروموزوم Y.....۱۴
شکل(۱-۴) ساختار و اجزای میتوکندری.....۱۸
شکل(۱-۵) ژنوم میتوکندریایی انسان.....۲۰
شکل(۱-۶) میانکنش های هسته- میتوکندری.....۲۱
شکل(۱-۷) مدل slipped-strand.....۲۳
شکل(۱-۸) مدل ایجاد حذف های mtDNA در طول ترمیم DSB (double strand breaks).....۲۴
شکل(۱-۹) نقش های فرضی و اثبات شده میتوکندری در اسپرماتوژنز و ناباروری مردان.....۲۹
شکل(۱-۱۰) موقعیت حذف 4977-bp در mtDNA.....۳۰
شکل (۲-۱) محل اتصال پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به صورت شماتیک.....۴۲
شکل (۲-۲) Alignment پرایمرهای T1-forward و T2-reverse با نرم افزار Oligo 7.....۴۳
شکل (۲-۳) Alignment پرایمرهای D1-forward و D2-reverse با نرم افزار Oligo 7.....۴۴
شکل(۲-۴)پروفایل حرارتی واکنش PCR.....۴۵
شکل(۳-۱) تصویر میکروتیوپ حاصل از سانتریفیوژ شیب چگالی.....۴۸
شکل(۳-۲) DNA ی ژنومی استخراج شده از اسپرم روی ژل آگارز ۰/۸٪.....۴۹
شکل(۳-۳) تصویر مربوط به ژل آگارز ۲٪ محصولات مرحله اول PCR.....۵۰
شکل(۳-۴) تصویر مربوط به ژل آگارز ۲٪ محصولات دو مرحله ی PCR مربوط به نمونه های بیمار و کنترل.....۵۱
شکل(۳-۵) نمودار مربوط به فراوانی وقوع حذف در افراد کنترل و بیمار.....۵۲

فهرست جداول

جدول(۱-۱) SNP ها و جهش های گزارش شده در mtDNA مرتبط با ناباروری مردان.....۲۷
جدول(۲-۱) مواد مصرفی در واکنش PCR.....۴۱
جدول(۲-۲) مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR.....۴۳
جدول (۲-۳) چرخه حرارتی PCR.....۴۴
جدول (۳-۱) نتایج آنالیز مایع منی افراد بیمار.....۴۷

چکیده

بررسی جهش DNA میتوکندریایی در بیماران مبتلا به واریکوسل

نسرین غنمی گشتی

واریکوسل پیچ و خم و اتساع غیر عادی سیاهرگ های شبکه وریدی پامپینیفورم (pampiniform) در طناب اسپرماتیک است، و شایع ترین دلیل قابل اصلاح ناباروری در مردان می باشد. اگرچه پاتوفیزیولوژی دقیق آسیب های القا شده توسط واریکوسل به طور کامل آشکار نشده است، مطالعات بسیاری افزایش استرس اکسیداتیو را در سرم، مایع منی و بافت بیضه ای بیماران مبتلا به واریکوسل گزارش نموده اند. استرس اکسیداتیو در مایع منی و بافت بیضه ای، ممکن است منجر به آسیب به DNA ی اسپرم شود. برخلاف DNA ی هسته ای، DNA ی میتوکندریایی (mtDNA) فاقد حفاظت هیستون ها بوده و به طور کلی نسبت به ژنوم هسته ای تعمیرات کمتری در آن صورت می گیرد، بنابراین با فرکانس بیشتری دچار جهش می شود. mtDNA به طور خاص مستعد حذف های با مقیاس بزرگ است. یکی از این حذف ها، حذفی به طول ۴۹۷۷-bp می باشد که به حذف عمومی یا common deletion معروف است. این حذف چندین ژن زنخیره تنفسی را در بر گرفته و به این دلیل می تواند منجر به نقص در تولید ATP شود. بنظر می رسد که در واریکوسل تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر (reactive oxygen species) افزایش می یابد و در نتیجه سبب القای استرس اکسیداتیو می شود. بنابراین این بیماری می تواند منجر به ایجاد جهش هایی در mtDNA، از جمله حذف ۴۹۷۷-bp شود، که نتیجه آن ممکن است کاهش تحرک اسپرم و ناباروری در مردان باشد. هدف از این مطالعه، بررسی جهش حذفی به طول ۴۹۷۷-bp در mtDNA ی اسپرم بیماران مبتلا به واریکوسل است. به منظور ردیابی این حذف در mtDNA ی اسپرم، نمونه منی از ۳۰ مرد نابارور مبتلا به واریکوسل و ۴۵ مرد نرمال به عنوان کنترل تهیه شد. پس از استخراج کل DNA (total DNA) از اسپرم، جهت بررسی حذف مورد نظر، تکنیک Gap PCR انجام گردید. فراوانی حذف ۴۹۷۷-bp در افراد بیمار و کنترل به ترتیب برابر با ۹۳/۳۳٪ و ۱۷/۷۷٪ بود. تفاوت معنی داری بین فراوانی این حذف در mtDNA ی اسپرم افراد بیمار وکنترل بدست آمد (CI 95% = 12.74-328.97, OR = 64.75, *P<0.0001*). در نتیجه، فرکانس بالای حذف ۴۹۷۷-bp در ژنوم میتوکندریایی اسپرم، احتمالاً یک فاکتور مهم در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل بوده و ممکن است به دلیل تأثیر بر تولید انرژی و کیفیت اسپرم، باعث ناباروری در آنها شده باشد. با این حال، مطالعات بیشتری جهت درک نقش حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA ی اسپرم و القای ناباروری در مردان مبتلا به واریکوسل مورد نیاز است.

کلیدواژه: جهش های DNA میتوکندریایی، واریکوسل، استرس اکسیداتیو، ناباروری مردان.

Abstract

Analysis of mitochondrial DNA mutation in patients with varicocele

Nasrin Ghanami Gashti

Varicocele is the abnormal tortuosity and dilatation of the veins of the pampiniform plexus within the spermatic cord and is one of the amendable causes of male infertility. Although the exact pathophysiology of varicocele-induced damages has not yet entirely realized, a large number of studies have revealed increase of oxidative stress in serum, semen and testicular tissues of patients with varicocele. Oxidative stress in semen and testicular tissues may cause sperm DNA damage. Unlike nuclear DNA, mitochondrial DNA (mtDNA) lacks the protection of histones and generally is repaired less efficiently than nuclear DNA, so it mutates much more frequently. The mtDNA is especially prone to large scale deletions. One of these deletions is 4977-bp deletion or 'common deletion'. This deletion in mtDNA that embraces multiple respiratory chain genes may cause defect in ATP production. It has been suggested that varicocele increases reactive oxygen species production and induce oxidative stress, so it may induce mutations in mtDNA such as 4977-bp deletion, resulting in decreased motility of sperm and male infertility. The purpose of this study was to analyse sperm mtDNA 4977-bp deletion in patients with varicocele. In order to detection of 4977-bp deletion in sperm mtDNA, semen samples of 30 infertile patients with varicocele and 45 normal men were prepared. After DNA extraction from sperm, in order to analysis of the deletion, Gap polymerase chain reaction (Gap PCR) was performed. Deletion frequency in patient and control groups was 99.33% and 17.77%, respectively. Strong association (95%CI 12.74-328.97; OR= 64.75; $P<0.0001$) between sperm mtDNA 4977-bp deletion and varicocele-induced infertility was confirmed, overall. In conclusion, sperm mtDNA 4977-bp deletion may be an important contributor factor in infertile men with varicocele. Larger population-based studies are needed to determine the relation between this deletion and varicocele-associated infertility.

Keywords: mtDNA mutations, varicocele, oxidative stress, male infertility.

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه

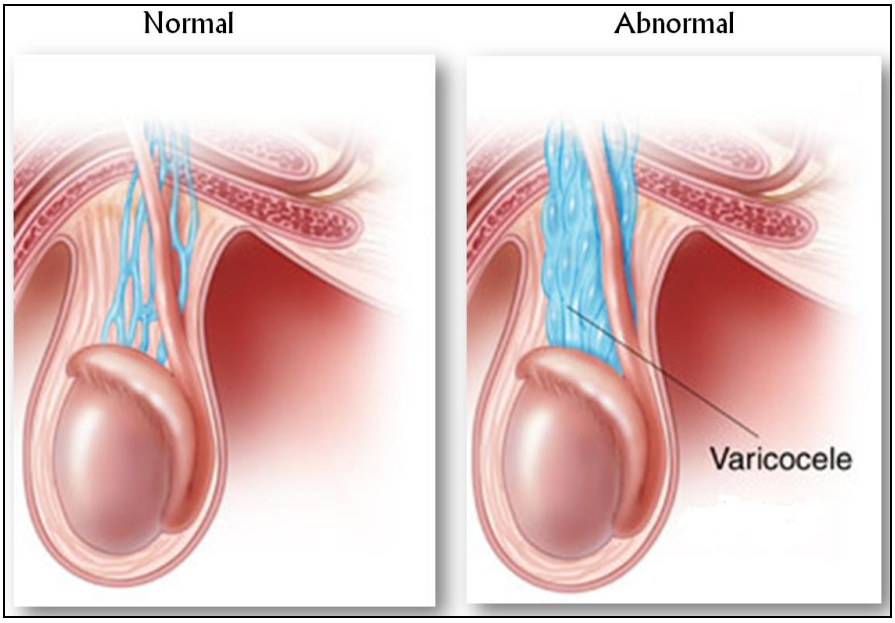
۱-۱- واریکوسل[1]

واریکوسل با پیچ و خم و اتساع غیرعادی سیاهرگ های شبکه پامپینیفرم (pampiniform) در طناب اسپرماتیک مشخص می شود و شایع ترین دلیل قابل اصلاح ناباروری در مردان می باشد (شکل ۱-۱). این بیماری در ۲۰-۱۵٪ کل جمعیت مردان و در ۴۰-۳۰٪ مردان نابارور وجود دارد (Jarrow, 2001). علاوه بر این، واریکوسل در ۸۱-۶۹٪ مردان مبتلا به ناباروری ثانویه دیده می شود (Gorelick and Goldstein, 1993). واریکوسل ممکن است سبب درد اسکروتال یا احساس کشیدگی شود که پس از ورزش یا فعالیت سخت، این وضعیت بدتر می شود. این بیماری پیش رونده بوده و عموماً (در ۹۰٪ موارد) در سمت چپ بیضه یافت می شود. بر اساس یکی از فرضیات، واریکوسل در نتیجه دریچه های ناکامل در سیاهرگ های اسپرماتیک به وجود می آید. به لحاظ کیلینیکی واریکوسل به سه درجه تقسیم می شود:

- **درجه ۱:** تنها به وسیله valsalva maneuver قابل لمس است.
- **درجه ۲:** در حالت استراحت قابل لمس است، اما قابل رویت نیست.
- **درجه ۳:** قابل لمس و رویت در حالت استراحت می باشد.

علی رغم تحقیقات قابل توجه در این زمینه، مکانیسم پاتوفیزیولوژیکی دقیقی که توسط آن واریکوسل منجر به ناباروری می شود، ناشناخته باقی مانده است (Saleh *et al.*, 2003)، اما آنالیزهای سازمان سلامت جهانی[2] به وضوح مشخص کرده است که واریکوسل با ناهنجاری های مایع منی، کاهش حجم بیضه و نقص در عملکرد سلول های لیدیگ ارتباط دارد (Dohle *et al.*, 2005). سبک زندگی و زمینه ی ژنتیکی بیمار بر میزان حساسیت او نسبت به اثرات این بیماری تأثیرگذار است. درمان واریکوسل معمولاً از طریق جراحی (Varicocelectomy) انجام می شود. در بیشتر موارد با درمان واریکوسل، پارامترهای مایع منی بهبود یافته و بیمارانی که زمینه ژنتیکی ندارند، باروری خود را به دست می آورند.

1. Varicocele
2. World Health Organization



شکل(۱-۱) واریکوسل. این شکل برش طولی بیضه را نشان می دهد. اتساع سیاهرگ های درون طناب اسپرماتیک نسبت به حالت نرمال به خوبی قابل مشاهده است (برگرفته از www.urologyhealth.org).

۱-۱-۲- اتیولوژی[1] واریکوسل

اتیولوژی واریکوسل چند عاملی[2] است (Skoog *et al*,. 1997). تئوری های بسیاری در مورد دلیل ایجاد واریکوسل مطرح شده است. شناخته شده ترین این تئوری ها عبارتند از:

- تفاوت در آناتومی ساختاری سیاهرگ اسپرماتیک داخلی راست و چپ.
- دریچه های ناقص یا فقدان دریچه های عروق اسپرماتیک، که منجر به جریان خون رو به عقب[3] می شوند.
- اثر nutcracker- به معنی فشردگی سیاهرگ کلیوی چپ بین آئورت و سرخرگ مزانتریک فوقانی که باعث انتقال

1. Etiology
2. Multifactorial
3. Retrograde blood flow

فشار بالا به سیاهرگ اسپرماتیک داخلی می شود.

۱-۱-۳- پاتوفیزیولوژی واریکوسل

پاتوفیزیولوژی واریکوسل نیز چندعاملی است. مکانیسم دقیق ایجاد عملکرد بیضه ای معیوب در افراد مبتلا به واریکوسل، که باروری آنها را تحت تأثیر قرار می دهد، ناشناخته است. در ادامه به چند مکانیسم که به طور وسیعی پذیرفته شده اند، اشاره می شود.

۱-۱-۱-۳- افزایش دمای اسکروتال

به طور طبیعی بیضه ها در زمان تولد در اسکروتوم قرار می گیرند، زیرا دمای مناسب برای اسپرماتوژنز $^{\circ}C$ ۴-۳ پایین تر از دمای بدن است. در صورت عدم جابجایی بیضه ها از حفره شکمی بداخل اسکروتوم، اسپرماتوژنز مختل می شود. علاوه بر موقعیت بیضه ها، دو عامل کلیدی دیگر نیز در خنک سازی آنها نقش دارند. اولین عامل وجود یک سطح موج دار غنی از عروق در اسکروتوم است، که از طریق آن گرما با محیط مبادله می شود. عامل دوم وجود یک شبکه سرخرگی- سیاهرگی (شبکه pampiniform) در طناب اسپرماتیک است که به صورت یک مبادله کننده ی دما عمل می نماید. به این صورت که خون سرخرگی در حال ورود به بیضه با خون سیاهرگی خنک تر بیضه که در حال خروج از آن است، مبادله دمایی می کند (Piner *et al.*, 2002). اتساع سیاهرگ های این شبکه که در بیماری واریکوسل رخ می دهد، باعث اختلال در این تبادل دمایی می شود. هر چند، در چندین گزارش تفاوتی بین دمای اسکروتال در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل و مردان نابارور بدون واریکوسل یافت نشد (Lund and Nielsen,1996; Mieusset *et al.*, 1987). علاوه بر واریکوسل، عواملی که می توانند بر دمای اسکروتال تأثیر بگذارند، شامل: بیماری های تب زا مثل آنفولانزا، قرار گیری در معرض گرما به واسطه شغل (مانند نانواها، جوشکارها، کارگران کارخانه های ذوب فلزات) و یا از طریق حمام داغ و سونا می باشد (Mieusset and Bujan, 1995; Thonneau *et al.*, 1998). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد گرما با تأثیر

بر تولید آندروژن، اثرات زیان باری بر تولید اسپرم دارد (Shiraishi *et al*., 2009). تماس با گرما منجر به هیپوکسی[1] و استرس اکسیداتیو در سلول های جنسی شده و تأثیر آن با بیان فاکتورهایی که سلول های جنسی را به سمت آپاپتوزیس پیش می برند، مشخص می شود. این شرایط باعث آسیب به DNA ی اسپرم نیز می شود و از این طریق می تواند باروری مرد را تحت تأثیر قرار دهد (Paul *et al*., 2009).

۱-۱-۳-۲- واریکوسل و ایجاد استرس اکسیداتیو

ارتباط بین ناباروری و ایجاد گونه های اکسیژن واکنش پذیر یا reavtive oxygen species (ROS) ثابت شده و به طور وسیعی مطالعه گردیده است. ROS شامل پراکسید هیدروژن و رادیکال های آزاد ناپایدار (مانند رادیکال هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید) است که دارای الکترون غیر جفت در اوربیتال های خارجی خود هستند. تغییر در ریز محیط و گردش خون بیضه در اثر واریکوسل، می تواند تولید ROS را افزایش و ظرفیت آنتی اکسیدانتی موضعی را کاهش دهد که در نتیجه آن استرس اکسیداتیو ایجاد می شود (Agarwal *et al*., 2009). مکانیسم افزایش استرس اکسیداتیو در اثر واریکوسل کاملاً مشخص نیست. این افزایش می تواند در نتیجه مکانیسم های جبرانی مختلفی باشد که در بیماران مبتلا به واریکوسل عمل کرده و به حفظ اسپرماتوژنز کمک می کنند. برخی از این مکانیسم ها برای اسپرم زیان آورند، زیرا می توانند منجر به تنظیم افزایشی یا کاهشی مسیرهای مختلف و مکانیسم های مولکولی درگیر در تشکیل رادیکال های آزاد شوند (Nallella *et al*., 2004; Ishikawa *et al*., 2007). وجود استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، خون سیاهرگ اسپرماتیک و سمینال پلاسمای مردان نابارور مبتلا به واریکوسل در چندین مطالعه گزارش شده است. استرس اکسیداتیو می تواند باعث آسیب های مولکولی و ژنتیکی شود که در نتیجه آن ناباروری در مردان ایجاد می شود (Benoff *et al*., 2004). برخی از پارامترهای استرس اکسیداتیو مانند ROS و lipid peroxidation در بیماران نابارور مبتلا به واریکوسل، نسبت افراد کنترل به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد (Hendin *et al*., 1999).

1. Hypoxia

پراکسیداسیون لیپید ها، سیالیت غشای پلاسمایی اسپرم را افزایش داده و بنابراین باعث نقص عملکردی در فرآیند الحاق اسپرم-اووسیت خواهد شد. استرس اکسیداتیو القا شده توسط واریکوسل، با افزایش میزان محصول فرعی 4-hydroxy-2-nonenal که در اثر پراکسیداسیون لیپیدها ایجاد می شود، نیز مشخص می گردد (Shiraishi and Natio, 2005). تولید سطوح نرمال ROS برای عملکرد اسپرم ضروری است و از طریق انتقال پیام درون سلولی، منجر به تسهیل ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی و اتصال به اووسیت می شود (de Lamirande and Gagnon, 1995; de Lamirande and Lamothe, 2009). اما شرایط پاتولوژیکی مانند واریکوسل که منجر به افزایش تولید ROS می شوند، علاوه بر پراکسیداسیون غشای پلاسمایی اسپرم، بر مرفولوژی و تحرک آن تأثیر منفی می گذارند (Aitken and Clarkson, 1987; Alvarez, 1987). در ادامه به برخی از مکانیسم های احتمالی که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در افراد مبتلا به واریکوسل می شوند، اشاره می شود.

۱-۱-۳-۲-۱- سایتوکین ها (ILs):

سایتوکین ها[1] احتمالاً در عملکرد بیضه نقش تنظیمی ایفا می کنند. سطوح نرمال اینترلوکین IL-1 عملکرد سلول های سرتولی و لیدیگ را تنظیم کرده و در اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز شرکت می کند. بیان IL-1 در افراد مبتلا به واریکوسل افزایش می یابد (Agarwal *et al*., 2009). IL-1 در بسیاری از بافت ها رادیکال های آزاد ایجاد می کند و نقش سایتوکین ها به عنوان واسطه گرهای استرس اکسیداتیو به خوبی شناخته شده است. بنابراین بیان بالای IL-1 می تواند باعث تولید مقادیر بالایی از ROS در بیضه های واریکوسلی شود که در نتیجه آن پاسخ التهابی ایجاد شده و به بافت بیضه آسیب وارد می شود.

1. Cytokines

۱-۱-۳-۲-۲- نیتریک اکساید (NO)

نیتریک اکساید به شکل موضعی تولید شده و در تنظیم گردش خون بیضه دخیل است. NO از L-arginine و توسط فعالیت کاتالیتیکی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز[1] (NOS) تولید می شود. در بیضه های واریکوسلی بیان NOS به دلیل هیپوکسی القا شده در اثر گرفتگی وریدی، تنظیم افزایشی دارد تا به عنوان یک مکانیسم جبرانی، گردش خون سرخرگی بیضه را حفظ کند. NO با آنیون سوپراکسید واکنش داده و به متابولیت های فعال peroxynitrite و peroxy nitrous acid که هر دو از اکسیدانت های قوی هستند، تبدیل می شود. علاوه بر این، بین افزایش دمای بیضه و افزایش سطوح NO با افزایش آپاپتوزیس در بیضه های واریکوسلی، ارتباط وجود دارد (Agarwal *et al*., 2009).

۱-۱-۳-۲-۳- Gelial cell line-derived neurotrophic factor receptor α_1

فاکتور نروتروفیک مشتق از سلول گلیا، یک فاکتور رشد در مغز می باشد که در اسپرماتوژنز نیز نقشی حیاتی دارد. علاوه بر اسپرماتوژنز، این فاکتور در سنتز DNA نیز نقش دارد. در واریکوسل درمان نشده، کاهش بیان گیرنده این فاکتور در سیتوپلاسم سلول های لیدیگ و اسپرماتیدها وجود دارد (Akkoyunlu *et al*., 2007). نقش این گیرنده، حفاظت نورون ها از استرس اکسیداتیو است (Chen *et al*., 2001). کاهش بیان این گیرنده در بخش های مختلفی از بیضه های واریکوسلی گزارش شده است، که ممکن است مسئول ایجاد استرس اکسیداتیو در بیضه ها باشد.

۱-۱-۳-۳- تأثیر واریکوسل بر میزان آنتی اکسیدانت ها

در افراد مبتلا به واریکوسل میزان آنتی اکسیدانت ها در خون و سمینال پلاسما کاهش می یابد. ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل در بیماران نابارور مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد کنترل، به میزان قابل توجهی پایین تر است (Agarwal *et al*., 2004). سطوح پایین آنتی اکسیدانت کوآنزیم Q10 که در اسپرم افراد مبتلا به واریکوسل گزارش شده است، و همچنین سطوح پایین روی (Zn) در سمینال پلاسما که به عنوان یک آنتی اکسیدانت شناخته می شود، احتمالاً باعث حساسیت بالاتر

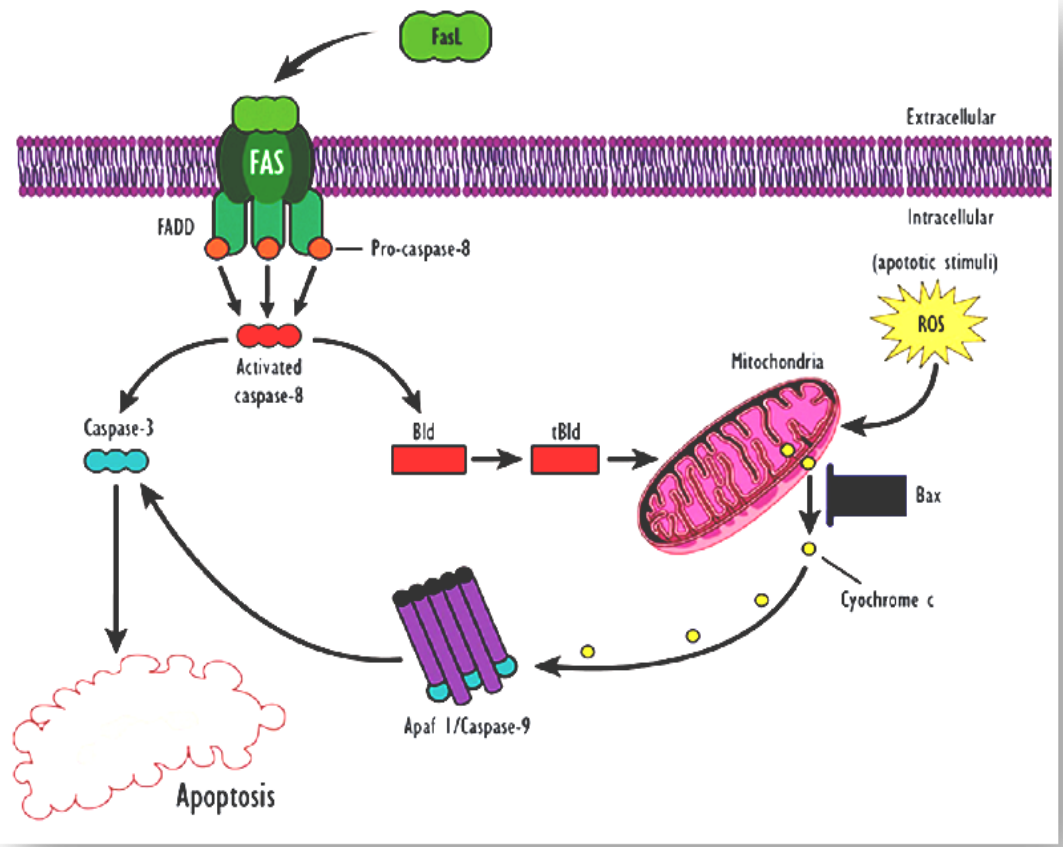
1. Nitric oxide synthase

نسبت به آسیب اکسیداتیو در این افراد می شود. در گروهی از مردان مبتلا به واریکوسل که پس از واریکوسلکتومی نابارور باقی ماندند، میزان روی در سمینال پلاسما پایین تر از حد نرمال گزارش شد. مصرف روی ممکن است باعث بهبود باروری آنها شود (Ando *et al*., 1989; Takihara *et al*., 1987). به نظر می رسد سطوح پایین آنتی اکسیدانت های آنزیمی خاص مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در پیشرفت واریکوسل مشارکت داشته باشند. کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی منجر به استرس اکسیداتیو می شود که به اسپرماتوزوا آسیب وارد می کند.

۱-۱-۳-٤- واریکوسل و القای آپاپتوزیس

آپاپتوزیس به عنوان یک فرآیند بنیادی که در هر دو شرایط نرمال و پاتولوژیکی وجود دارد، شناخته می شود. اسپرماتوژنز یک فرآیند تکثیری مداوم است که منجر به تولید میلیون ها اسپرم در روز می شود. بنابراین سطح آپاپتوزیس ممکن است بازده تولید اسپرم را در مردان نابارور که شامل مردان مبتلا به واریکوسل نیز می شود، تعیین کند. آپاپتوزیس می تواند سه رده از سلول های جنسی شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها را تحت تأثیر قرار دهد (Sinha-Hikim *et al*., 1998). مسیر های بسیاری وجود دارد که منجر به آپاپتوزیس می شود و به نظر می رسد این فرآیندها در سه سطح تنظیم می شوند: در سطح غشای سلول، در سطح سیتوپلاسم و در سطح هسته.

مسیر هایی که منجر به آپاپتوزیس می شوند به طور خلاصه در شکل(۱-۲) آورده شده است. ارتباط بین واریکوسل و آپاپتوزیس آشکار شده است. آپاپتوزیس ممکن است نقش مهمی در ایجاد اولیگواسپرمی در برخی از مردان مبتلا به واریکوسل ایفا کند. سه عامل که منجر به آپاپتوزیس می شوند و ناشی از اثرات واریکوسل هستند شامل استرس گرما، محرومیت از آندروژن و تجمع محرک های سمی است. در ادامه به هریک از این موارد به طور خلاصه اشاره می شود.



شکل(۱-۲) مسیرهای القا کننده آپاپتوزیس. سیتوکروم c یک فاکتور آپاپتوتیک مهم است که در نتیجه مسیرهای منتهی به آپاپتوزیس آزاد می شود. آسیب به میتوکندری توسط ROS تولید شده در اثر واریکوسل نیز می تواند منجر به آزاد شدن سیتوکروم c شود (برگرفته از Agarwal, 2005).

۱-۱-۳-٤-۱- نقش استرس گرما در القای آپاپتوزیس

شواهدی وجود دارد که افزایش دمای اسکروتال منجر به تحریک تولید پروتئین هایی می شود که سلول ها را به سمت آپاپتوزیس پیش می برند. در گزارشی مطرح گردیده است که پس از ۳۰ دقیقه گرم کردن اسکروتوم، بیان زودهنگام و افزایشی ژن آپاپتوزیسی *Bax* در سلول های جنسی رخ می دهد (Sinha-Hikim and Swerdloff, 1995). بررسی